

# ヒト癌細胞におけるサイトカインの発現とその意義 - Interleukin-6を中心に -

著者	阿部 基
号	2464
発行年	1992
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/20806">http://hdl.handle.net/10097/20806</a>

氏 名（本籍）	阿 <sup>あ</sup> 部 <sup>べ</sup> 基 <sup>もと</sup>
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 第 2 4 6 4 号
学位授与年月日	平 成 4 年 9 月 9 日
学位授与の条件	学位規則第4条第2項該当
最 終 学 歴	昭 和 60 年 3 月 15 日 昭和大学医学部医学科卒業
学 位 論 文 題 目	ヒト癌細胞におけるサイトカインの発現とその意義 －Interleukin-6 を中心に－

（主 査）

論文審査委員	教授 森 昌 造	教授 松 野 正 紀
	教授 菅 村 和 夫	

# 論 文 内 容 要 旨

## 【目 的】

癌患者の生命予後を規定するもっとも重要な因子は遠隔転移の有無であり、腫瘍の転移機構の解明が求められている。Tsuchiya, Takeda, Kumagai らはマウス腫瘍を用いた転移実験で肺転移をおこす細胞株からは GM-CSF, 肝転移をおこす細胞株からは IL-6 の発現が遺伝子および蛋白レベルで見られるという相関性を報告した。本論文は、ヒト腫瘍における GM-CSF, IL-6 遺伝子ならびに蛋白の発現の検討とその臨床的意義の解明を目的とした。

## 【方 法】

### ① ヒト固型癌からの IL-6, GM-CSF mRNA 解析

手術時に得られる癌組織および正常組織 1g を液体窒素処理し $-80^{\circ}\text{C}$ で保存。CsCl 密度勾配法によって total RNA を抽出し、逆転写酵素およびヒト IL-6 またはヒト GM-CSF anti-sense primer ( $-5'$ ) を用いて cDNA を合成した。さらに各 sense primer ( $-3'$ ), Tag polymerase を用いて PCR (polymerase chain reaction) 法によりこれを増幅し、さらに Southern Blotting をおこなって発現を検討した。

### ② 癌の進行度と血清サイトカイン値との相関性の検討

297名の癌患者の血清中のサイトカイン (IFN- $\beta$ , GM-CSF, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  および IL-6) を ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 法を用いて測定し、遠隔転移との関連性を検討した。各サイトカインに関して遠隔転移の有無で 2 群に分け有意差検定 (T 検定) を行って検討した。また 297 名中 174 名が乳癌患者であったため、各病期毎、さらに転移部位別にも検討を加えた。

### ③ ヒト固型癌での IL-6 の免疫組織学的検討

乳癌患者 10 名の腫瘍組織を液体窒素処理し $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。この凍結標本から  $5\mu$  の切片を作製し、抗 IL-6 単クローン抗体を用いた ABC 法によって免疫組織染色をおこない、腫瘍細胞、周囲組織の IL-6 発現を検討した。

## 【結 果】

① GM-CSF mRNA の検討は 37 例 (食道癌 12 例, 乳癌 15 例, 胃・結腸癌 7 例, 膵臓癌, 胆管癌, 腎細胞癌各 1 例) におこなったが陽性例はなかった。

一方, IL-6 mRNA の検討は 40 例 (食道癌 18 例, 乳癌 12 例, 胃・結腸癌 7 例, 膵臓癌, 胆管癌,

腎細胞癌各1例)に行なった。40例中13例に IL-6 mRNA 発現が見られた。これを原疾患別に見ると食道癌で発現率が高く (50.0%), 胃・結腸癌では28.6%, 乳癌では16.7%の発現率であった。食道癌症例においても各病期と発現率に関しての偏りは見られなかった。食道癌患者18名を IL-6 mRNA の発現の有無で2群に分けて Kaplan-Meire 法による生存曲線を検討すると IL-6 mRNA 発現群では生存率の低下が見られ一般化 Wilcoxon 検定では  $P=0.085$  であった。

② 血清 IFN- $\beta$ , GM-CSF 値は各々107名, 115名測定し, 遠隔転移のある群とない群 (以下, 両群) では値に有意差がなかった ( $P=0.34$ および $P=0.13$ )。

いわゆる炎症系サイトカインといわれる IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 値は各々162名, 144名測定し, 両群間には有意差はないが遠隔転移のある群で高値をとる傾向があった ( $P=0.07$ および $P=0.099$ )。

一方, 血清 IL-6 値は296名 (良性疾患27名を含む) 測定し, 遠隔転移のない群 ( $n=149$ ) と遠隔転移のある群 ( $n=120$ ) では unpaired T 検定を行なうと遠隔転移群で有意の上昇が見られた ( $P<0.01$ )。

ここで血清 IL-6 について遠隔転移を有する120名を肝転移の有無で2群に分けて検討すると肝転移を有する群 ( $n=42$ ) では肝転移を有さない群 ( $n=78$ ) に比べ有意の上昇を示していた ( $P=0.022$ )。

174名の乳癌患者の検討でも遠隔転移を有する stage IV および再発患者では stage I ~ III に比して有意の上昇が見られた ( $P<0.01$ )。この stage IV および再発患者の転移臓器別検討では肝転移および胸膜転移患者で有意な上昇が見られた ( $P<0.05$ ,  $\chi^2$  検定)。

③ 抗 IL-6 抗体を省略したネガティブコントロールでは陽性例はなかった。

乳癌患者10名のうち1例に腫瘍細胞が抗 IL-6 抗体に反応した IL-6 陽性症例が見られた。他の細胞にこの反応は見られなかった。

## 【総 括】

ヒト固型癌における GM-CSF および IL-6 mRNA の発現を分子生物学手法を用いて検討し, 多数の癌細胞に IL-6 mRNA の発現が確認された。

また, 各種癌患者血清中には進行度に応じて炎症系サイトカインが検出され, とくに IL-6 は遠隔転移を有する患者で有意に上昇しており, 肝転移患者で高値をとるものが多かった。免疫組織学的検討でも腫瘍細胞自身による IL-6 の産生が確認された。以上のようにヒト固型癌においても IL-6 が癌細胞の自律性増殖, 組織侵襲性, あるいは癌細胞の組織への接着など癌の進行のそれぞれのステップで重要な役割を演じていることが考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

がんの研究は発がん、転移機構およびその治療法などの解明に分けられる。本研究ではがんの転移機構に関して、がんの特定臓器への転移はがん細胞が発現する因子によって規定されるのではないかという仮設のもとに、とくにサイトカインの発現を中心に解析を試みた。マウスおよびマウス腫瘍を用いた腫瘍の転移実験において、肺転移を惹起する腫瘍からは GM-CSF の発現が、肝転移を起こす腫瘍からは IL-6 の発現が遺伝子レベルおよび蛋白レベルで認められることが報告されている。これらの事実を踏まえ、ヒト固形がんを対象に、がんの進展・転移とサイトカインの発現について検討を加えた。

方法は腫瘍組織中の GM-CSF, IL-6 などサイトカインの mRNA 発現を Northern blotting 法および Reverse transcription PCR 法を用いて解析した。また、蛋白レベルにおいても血清中サイトカインを ELISA 法にて定量的に測定し、サイトカインの発現とがんの進展について検討を加えた。

その結果、ヒト固形がんにおいても腫瘍細胞から IL-6 mRNA の発現が確認された。食道がんでは、乳がん、胃がん、結腸がんに比して IL-6 mRNA の発現が高く、食道がん IL-6 mRNA 発現群では非発現群に比して生存率の低下が認められた。

血清中サイトカインの検討では、がん遠隔転移を有する群において IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  および IL-6 の炎症性サイトカイン蛋白の上昇が認められた。とくに肝転移群で IL-6 蛋白の著名な上昇を認め、がんの転移と IL-6 蛋白の発現は密接に相関することが示唆された。さらに免疫組織化学的に IL-6 蛋白の発現を検討したところ、少数ではあるが、乳がん細胞に IL-6 陽性例がみられ、がん細胞における IL-6 蛋白発現が示唆された。

以上の結果から、サイトカインがヒト固形がんの転移と密接な関連があることが示された。本研究は今後のがん転移機構の解明に向けて重要な意義をもち、学位論文として価値する。